



**OPTIMALISASI AGAR COKLAT DARAH MANUSIA
SEBAGAI MEDIA UJI SENSITIVITAS ANTIBIOTIK
TERHADAP *Haemophilus influenzae* : PERAN PENCUCIAN
ERITROSIT SEBANYAK EMPAT KALI**

**JURNAL MEDIA MEDIKA MUDA
KARYA TULIS ILMIAH**

**Diajukan sebagai syarat untuk mengikuti ujian proposal Karya Tulis
Ilmiah
mahasiswa program strata-1 kedokteran umum**

**DUTA INDRIAWAN
G2A008063**

**PROGRAM PENDIDIKAN SARJANA KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
2012**

LEMBAR PENGESAHAN

**JURNAL MEDIA MEDIKA MUDA
KARYA TULIS ILMIAH**

**OPTIMALISASI AGAR COKLAT DARAH MANUSIA
SEBAGAI MEDIA UJI SENSITIVITAS ANTIBIOTIK
TERHADAP *Haemophilus influenzae* : PERAN PENCUCIAN
ERITROSIT SEBANYAK EMPAT KALI**

Disusun oleh

**DUTA INDRIAWAN
G2A008063**

Telah disetujui

Semarang, 8 Agustus 2012

Penguji

Pembimbing

**Dr. Endang Sri Lestari, PhD
19661016 199702 2 001**

**dr. Helmia Farida, M.KeS,Sp.A
19661213 200112 2 001**

Ketua Penguji

Dr. Subakir, Sp.MK, Sp.KK(K)

OPTIMALISASI AGAR COKLAT DARAH MANUSIA SEBAGAI MEDIA UJI SENSITIVITAS ANTIBIOTIK TERHADAP *Haemophilus influenzae* : PERAN PENCUCIAN ERITROSIT SEBANYAK EMPAT KALI

Duta Indriawan * Helmia Farida **

ABSTRACT

Optimizing human blood derived chocolate agar as a medium of antibiotic susceptibility test of Haemophilus influenzae : Role of four time washed erythrocyte

Background : *Haemophilus Test Media* is a standard medium for susceptibility test for *H.influenzae*. It is expensive and unavailable in Indonesia, so that susceptibility test of *H.influenzae* is not considerable to do. The use of human blood as a medium for antibiotic susceptibility testing of *Haemophilus influenzae* has not been done before.

Aim : *To compare the results antibiotic susceptibility test on media Haemophilus Test Media (HTM), sheep blood derived chocolate agar (ACD), human blood chocolate agar (ACM), and human blood derived chocolate agar with modifications of intensive erythrocytes washing (ACMC).*

Methods : *This study design was true-experimental designs post test only. Antibiotic susceptibility test was carried out by disc diffusion method (CLSI 2011) on media HTM, ACD, ACM and the ACMC against 11 strains of H.influenzae. Compatibility of the test results with HTM medium was measured using Kappa acceptance of $K > 0.80$.*

Result : *on ACD media, compatibility (Kappa) > 0.80 achieved by only 40% antibiotic tested (chloramphenicol and cotrimoxazole). On ACM, Kappa values > 0.80 only achieved on 60% antibiotic tested(chloramphenicol, cotrimoxazole, and tetracycline). On ACMC Kappa value > 0.80 only achieved on 80% antibiotic tested (ceftriaxone, chloramphenicol, cotrimoxazole, and tetracycline).*

Conclusion : *ACMC is slightly better than ACD, ACM for antibiotic susceptibility test for H.influenzae, but all of this media were still not feasible for use as an antibiotic susceptibility test of alternative media for H.influenzae. Modification is necessary to find another way to achieve excellent compliance with HTM.*

Keywords : *Haemophilus influenzae, Haemophilus Test Media, Human Blood Chocolate Agar, Antibiotic Susceptibility Test of Haemophilus influenzae*

*Mahasiswa Studi S1, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro

**Staf Pengajar Bagian Mikrobiologi Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro

ABSTRAK

Latar belakang : *Haemophilus Test Media* adalah media standar untuk melakukan uji sensitivitas terhadap *H.influenzae*. Harga HTM yang mahal dan tidak tersedianya media tersebut di Indonesia membuat uji sensitivitas untuk *H.influenzae* tidak banyak dilakukan. Penggunaan darah manusia sebagai media uji sensitivitas antibiotik terhadap *Haemophilus influenzae* belum pernah dilakukan sebelumnya.

Tujuan : Membandingkan hasil uji sensitivitas berbagai antibiotik pada media *Haemophilus Test Media* (HTM), agar coklat darah domba (ACD), agar coklat darah manusia tanpa modifikasi (ACM) dan agar coklat darah manusia dengan modifikasi pencucian eritrosit secara intensif (ACMC).

Metode : Penelitian ini menggunakan rancangan *true-experimental post test only*. Dilakukan uji sensitivitas antibiotik dengan metode difusi cakram (CLSI 2011) pada media HTM, ACD, ACM dan ACMC terhadap 11 strain *H.influenzae*. Kesesuaian hasil uji dengan media HTM diukur dengan Kappa dengan syarat penerimaan $K > 0,80$.

Hasil : Pada media ACD, kesesuaian (Kappa) $> 0,80$ hanya dicapai oleh 40% antibiotik (kloramfenikol dan kotrimoksazol). Pada ACM, nilai Kappa $> 0,80$ hanya terjadi pada 60% antibiotik (kloramfenikol, kotrimoksazol, dan tetrasiklin). Pada ACMC nilai Kappa $> 0,80$ hanya terjadi pada 80% antibiotik (seftriakson, kloramfenikol, kotrimoksazol, dan tetrasiklin).

Kesimpulan : ACMC lebih baik dari ACD dan ACM pada uji sensitivitas antibiotik terhadap *H.influenzae*, tetapi semua media ini masih belum layak digunakan sebagai media alternatif uji sensitivitas antibiotik untuk *H.influenzae*. Perlu dicari cara modifikasi yang lain agar dicapai kesesuaian yang sangat baik dengan HTM.

Kata kunci : *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus Test Media*, Agar Coklat Darah Manusia, Uji Sensitivitas Antibiotik Terhadap *Haemophilus Influenzae*

PENDAHULUAN

Haemophilus influenzae adalah bakteri berukuran kecil (1 μm X 0.3 μm), gram negatif berbentuk kokobasil, non motil, pleomorfik yang memerlukan media yang subur.¹ Bakteri ini sulit ditumbuhkan karena sifatnya yang *fastidious*, membutuhkan Hemin (faktor X) dan NAD (faktor V) dan inkubasi pada 35°C dengan konsentrasi CO₂ 5,5%.²

Haemophilus Test Media (HTM) adalah media standar untuk melakukan uji sensitivitas terhadap *H.influenzae*. Komposisi dari *Haemophilus Test Media* tidak lain adalah *Mueller Hinton Agar* yang ditambahkan faktor X dan faktor V.³⁻⁵ *Mueller Hinton* sendiri merupakan media yang digunakan sebagai media tes sensitivitas untuk bakteri-bakteri umum, tapi bukan untuk bakteri yang *fastidious* seperti *H.influenzae*, karena *H.influenzae* tidak dapat tumbuh pada agar *Mueller Hinton* . Harga HTM yang mahal dan tidak tersedianya media tersebut di Indonesia membuat uji sensitivitas untuk *H.influenzae* tidak banyak dilakukan.

Penggunaan agar coklat darah manusia yang dimodifikasi telah berhasil untuk menjadi media alternatif kultur *H.influenzae*. Namun, penggunaan agar coklat darah manusia yang dimodifikasi sebagai media uji sensitivitas terhadap *H.influenzae* belum pernah dilaporkan sebelumnya.

Agar coklat darah manusia (ACM) merupakan salah satu media yang murah dan mudah dalam pengadaannya. Namun, darah manusia memiliki banyak faktor inhibisi yang akan merusak faktor X dan V pada pemanasannya sehingga *H.influenzae* tidak dapat tumbuh dengan baik bila dibandingkan dengan media dari darah domba.^{6,7}

Salah satu intervensi yang akan dilakukan adalah mengenai optimalisasi agar coklat darah manusia yang dimodifikasi dengan pencucian eritrosit secara intensif (ACMC) sebagai media uji sensitivitas antibiotik terhadap *H.influenzae*. Pencucian eritrosit ini diharapkan mampu untuk mengurangi faktor inhibisi. Permasalahan penelitian ini adalah apakah ACM dengan pencucian eritrosit yang intensif dapat digunakan sebagai media uji sensitivitas terhadap antibiotik sebaik HTM dan ACD. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui cara terbaik untuk pembuatan agar coklat darah manusia dengan modifikasi cuci (ACMC) sebagai media uji sensitivitas sebaik HTM.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan dasar ilmiah tentang penggunaan agar coklat darah manusia sebagai pengganti agar coklat darah domba dan HTM sebagai media uji sensitivitas *H.influenzae* serta dapat memberikan bahan pertimbangan untuk penelitian selanjutnya tentang media uji sensitivitas antibiotik terhadap *H.influenzae*.

METODE

Penelitian ini menggunakan rancangan *true-experimental post test only*. Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang selama 3 bulan, dimulai pada bulan Maret – Mei 2012.

Berdasarkan perhitungan menggunakan rumus Federer replikasi minimal yang dibutuhkan untuk tiap perlakuan adalah 7

Pada penelitian ini dilakukan uji sensitivitas antibiotik dengan metode difusi cakram (CLSI 2011) pada media HTM, ACD, ACM dan APMC terhadap 11 strain *H.influenzae*. Kesesuaian hasil uji dengan media HTM diukur dengan Kappa dengan syarat penerimaan $K > 0,80$. Analisis data diolah program komputer dengan uji statistik Kappa dengan nilai *agreement* minimum $> 0,80$

HASIL

Analisis inferensial adalah analisis statistik yang digunakan untuk mengambil keputusan. Uji statistik yang digunakan adalah uji statistik Kappa, untuk menentukan kesesuaian antara media standar (HTM) dengan media modifikasi.⁸

Tabel 1. *Strength of Agreement*

<i>Value of K</i>	<i>Strength of agreement</i>	
< 0.20	<i>Poor</i>	<i>(slight agreement)</i>
0.21 - 0.40	<i>Fair</i>	<i>(fair agreement)</i>
0.41 - 0.60	<i>Moderate</i>	<i>(moderate agreement)</i>
0.61 - 0.80	<i>Good</i>	<i>(substansial agreement)</i>
0.81 – 0.99	<i>Very good</i>	<i>(almost perfect agreement)</i>

Dalam penelitian ini *agreement* atau kesesuaian nilai uji statistik Kappa menunjukkan tingkat kesesuaian serta ketepatan atau presisi media modifikasi sebagai media uji sensitivitas antibiotik terhadap *H.influenzae*.

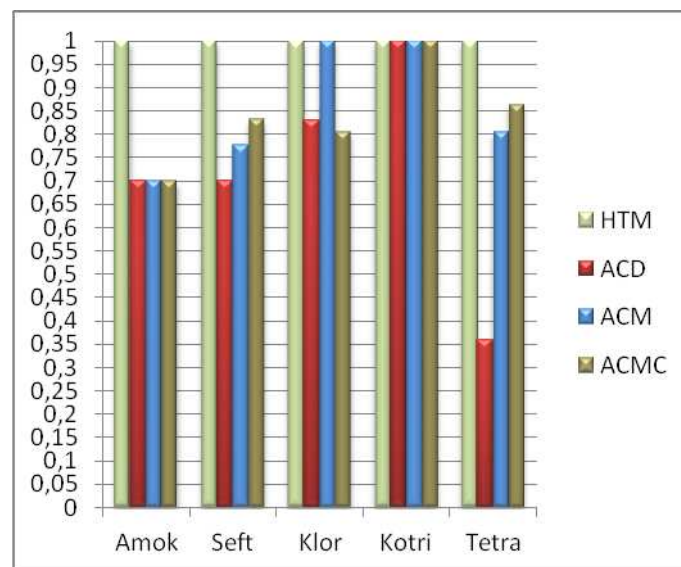
Dalam bidang kedokteran, *strength of agreement* hasil penelitian yang dapat dikatakan layak apabila mencapai nilai di atas 0,80 (*very good/almost*

perfect agreement). Semakin tinggi nilai *agreement* media modifikasi maka semakin sesuai media tersebut dengan media standar uji sensitivitas (HTM).

Tabel 2. Perbandingan data resisten dan sensitif antibiotik

Media	Amox		Tetra		Seft		Klor		Kotri	
	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S
HTM	3	19	7	5	3	19	4	18	1	21
ACD	5	17	15	7	5	17	3	19	1	21
ACM	5	17	9	13	2	20	4	18	1	21
ACMC	5	17	9	13	4	18	5	17	1	21

Gambar 1. *Strength of agreement* berbagai media uji



Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, pada media agar coklat darah domba (ACD) didapatkan nilai Kappa yang baik (lebih dari 0,80) pada dua

(40%) antibiotik yang diuji, yaitu untuk antibiotik kloramfenikol dan kotrimoksazol, sedangkan pada antibiotik amoksisilin asam klavulanat, seftriakson dan tetrasiklin nilai Kappa kurang dari 80%.

Pada ACM nilai Kappa lebih dari 0,80 hanya terjadi pada tiga (60%) antibiotik yang diuji, yaitu kloramfenikol, kotrimoksazol, dan tetrasiklin, sedangkan pada antibiotik amoksisilin asam klavulanat nilai Kappa kurang dari 0,80.

Pada media ACD nilai Kappa lebih dari 0,80 tercapai pada empat (80%) dari antibiotik yang diuji, yaitu seftriakson, kloramfenikol, kotrimoksazol, dan tetrasiklin. Untuk antibiotik amoksisilin asam klavulanat, nilai Kappa kurang dari 0,80.

Pada semua pengamatan diatas, ketidaksesuaian disebabkan oleh pembentukan diameter zona inhibisi yang lebih kecil daripada HTM, sehingga antibiotik pada media HTM terbaca sensitif, sedangkan pada media ACD, ACM dan ACDM terbaca resisten.

PEMBAHASAN

Dari penelitian ini didapatkan bahwa ACD, ACM dan ACDM memiliki nilai kesesuaian dengan HTM (Kappa) di bawah standar, yang berarti ketiga media ini tidak layak digunakan sebagai media alternatif pengganti HTM.

Pada uji sensitivitas antibiotik dengan metode difusi terdapat beberapa faktor teknis yang mempengaruhi ukuran diameter zona inhibisi, antara lain kepekatan inokulum, waktu pemasangan cakram, suhu inkubasi, waktu inkubasi,

ukuran *plate*, ketebalan media, pengaturan jarak cakram antibiotik, kecepatan difusi antibiotik, derajat sensitifitas mikroorganisme, dan kecepatan pertumbuhan bakteri, dan komposisi media.

Pada penelitian ini telah dikontrol semua faktor yang disebutkan di atas supaya sama kecuali komposisi media yang memang dibuat berbeda. Apabila terdapat perbedaan pada salah satu faktor akan mempengaruhi hasilnya karena akan memperbesar atau memperkecil ukuran diameter zona inhibisinya. Karena adanya perbedaan dari komposisi medianya maka hasil yang didapat bisa berbeda dari nilai kekesuaian dari media standar (HTM) dengan media modifikasi.

ACM tidak memungkinkan untuk tumbuh secara optimal karena kandungan nutrisinya lebih sedikit dibandingkan dengan zat-zat antibakterial (komplemen, antibodi, antikoagulan). Selain itu media yang bersifat lebih padat dari HTM karena penambahan darah manusia. APMC memiliki komposisi yang serupa dengan ACM, namun pada media ini agar coklat darah manusia ini telah dimodifikasi dengan pencucian eritrosit secara intensif (empat kali). Proses pencucian eritrosit tersebut diharapkan menjadi intervensi yang ideal karena dapat mengeliminasi komplemen serta antibodi yang bersifat *heat-stable* dan juga antikoagulan yang bersifat bakterostatik. Tetapi APMC memiliki nutrisi yang kurang dan hilangnya faktor-faktor inhibisi seperti komplemen antibiotik dan antikoagulan pada media ini. Media pada APMC lebih padat dibandingkan dengan HTM akibatnya diameter zona inhibisinya lebih kecil.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa media ACMC mampu mencapai $K > 0,80$ pada keempat (80%) antibiotik, yaitu seftriakson, kloramfenikol, kotrimoksazol dan tetrasiklin, sedangkan pada antibiotik amoksisilin asam klavulanat $K < 0,80$.

Terdapat 2 hal yang mungkin mempengaruhi antibiotik amoksisilin asam klavulanat sehingga belum mencapai nilai uji statistik Kappa lebih dari 0,80 yaitu pertumbuhan dan metabolisme koloni bakteri yang belum optimal, serta difusi antibiotik pada media ACM.

Pencucian eritrosit mampu menghilangkan faktor inhibisi pertumbuhan *H.influenzae*. Namun, intervensi ini tidak menambah jumlah nutrisi yang dibutuhkan sehingga pertumbuhan *H.influenzae* tidak optimal. Pertumbuhan *H.influenzae* yang tidak optimal inilah yang menyebabkan uptake (pengambilan) antibiotik tidak optimal pula. Hal inilah yang memungkinkan memberi hasil diameter inhibisi pada amoksisilin asam klavulanat lebih kecil. Kemungkinan lainnya dikarenakan media ACMC yang lebih pekat dibandingkan dengan HTM, sehingga difusi antibiotik ke media ACMC menjadi yang kurang baik pula.

Pada ACD didapatkan hanya dua (40%) antibiotik yang mencapai $K > 0,80$, sedangkan pada ACM tiga (60%) antibiotik. Hal ini menunjukkan bahwa kedua media belum mampu mencapai $K > 0,80$ yaitu pertumbuhan bakteri belum optimal.

ACD memiliki faktor X dan faktor V yang menyebabkan pertumbuhan bakteri pada media ACD baik. Komposisi agar yang baik dipengaruhi oleh kandungan nutrisi, kepadatan media serta difusi antibiotik. Pada ACD kaya akan kandungan nutrisi, media ini juga memiliki kepadatan media yang cukup baik, sedangkan difusi antibiotik yang dihasilkan pada media ini belum optimal yang dapat disebabkan karena membran eritrosit dan komposisi biokimiawi.

Pada ACM pertumbuhan bakteri yang dihasilkan belum optimal karena memiliki faktor inhibisi yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri sehingga akan mempengaruhi kecepatan metabolisme bakteri dan difusi serta kerja antibiotik yang menyebabkan ketidakakuratan dalam uji sensitivitas antibiotik. Sedangkan kandungan nutrisinya kurang baik, kepadatan media ini juga sama baiknya dengan ACD. Perbedaan pada morfologi eritrosit pada ACM dengan ACD memungkinkan terjadinya perbedaan pada difusi antibiotik kedua media.

Kemudahan dalam penyediaan bahan dasar agar coklat darah manusia dengan modifikasi, yaitu darah manusia, menjadikan media ini mudah dibuat dan membutuhkan biaya produksi yang minimal.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa ACMC lebih baik daripada ACD dan ACM dalam hal kesesuaian hasil uji antibiotik pada media HTM, tetapi masih belum ideal sebagai media alternatif uji sensitivitas antibiotik untuk *H.influenzae*. Media agar coklat darah domba (ACD) dan media agar coklat darah manusia standar (ACM) memiliki nilai kesesuaian yang tidak baik

dengan media standar (HTM). Media agar coklat darah manusia dengan modifikasi pencucian eritrosit secara intensif (ACMC) lebih ekonomis jika dibandingkan dengan *Haemophilus Test Media* (HTM) dan agar coklat darah domba (ACD).

SARAN

Perlu dicari cara modifikasi ACM yang lain agar diperoleh media alternatif dengan nilai Kappa > 0,80 untuk semua antibiotik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT, atas segala nikmat dan rahmatNya. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi (DIKTI) selaku sponsor yang telah mendanai biaya penelitian ini, dr. Helmia Farida, M.Kes, Sp.A selaku dosen pembimbing atas saran dan bimbingannya. Kepada dr. Endang Sri Lestari, PhD selaku penguji dan dr. Subakir, Sp.MK, Sp.KK(K) selaku ketua penguji. Serta tidak lupa kepada orangtua, keluarga, teman-teman, serta pihak-pihak yang telah mendoakan dan membantu selama pelaksanaan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kuhnert P; Christensen H (editors). 2008. *Pasteurellaceae: Biology, Genomics and Molecular Aspects*. Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-34-9.
2. Jorgensen J.H., Redding S. S., Maher L.A. and Howell A.W. 1987. *J.Clinical Microbiology*, 25:2105
3. Elma Krumwiede And Ann G. Kuttner, M.D. 1973. *A Growth Inhibitory Substance For The Influenza Group Of Organisms In The Blood Of Various Animal Species The Use Of]~ The Blood Of~ Various Animals As A Selective Medium For The Detection Of Hemolytic Streptococci In Throat Cultures*. Irvington House, Irvington-On-Hudson. New York.
4. *Haemophilus influenzae* and Hib Meningitis today's online textbook of bacteriology
5. *Haemophilus influenza* www.wikipedia.org
6. Puri J, Talwar V, Juneja M, Agarwal KN, Gupta HC. 1999. *Prevalence of anti-microbial resistance among respiratory isolates of Haemophilus influenzae*. *Indian Pediatr* 36 (10): 1029–32. PMID 10745313
7. Lysenko E, Ratner A, Nelson A, Weiser J (2005). "The role of innate immune responses in the outcome of interspecies competition for colonization of mucosal surfaces". *PLoS Pathog* 1 (1): e1. doi:10.1371/journal.ppat.0010001
8. Cohen, J. (1968). "Weighted kappa: Nominal scale agreement with provision for scaled disagreement or partial credit". *Psychological Bulletin* 70 (4): 213–220. doi:10.1037/h0026256. PMID 19673146.